CELLYARD® beads 200

Surface activated cell carrier beads for high density cell culture

INSTRUCTION MANUAL

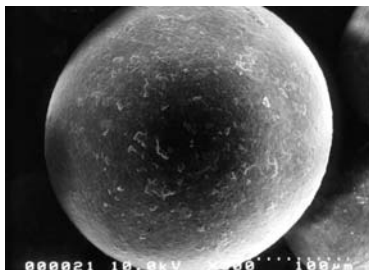



Fig.1　SEM photograph of CELLYARD beads

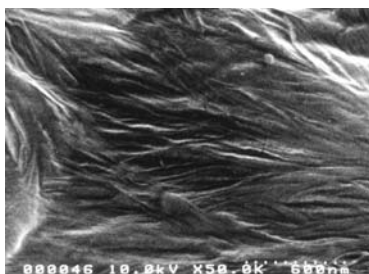



Fig.2　SEM photograph of the surface of nylon particle

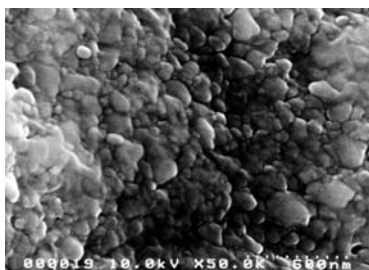



Fig.3　SEM photograph of the surface of CELLYARD beads

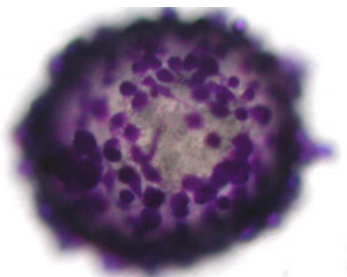



Fig.4　The C6/36 cells adhering to the surface of CELLYARD beads

1．USE

The high-density mass culture of various attachment dependent cell .

2．MERIT

1）The CELLYARD beads (Fig.1) is composed of microspheres that hydroxyapatite 〔$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$〕 fine particles cover the surface of the nylon particles of average particle size 200 μ m . Hydroxyapatite is one of calcium phosphate system compounds , has excellent biocompatibility , and has already been used as artificial bone , bone prosthetic material , and so on .
In comparison with surface of the nylon particle (Fig.2) and surface of the CELLYARD beads (Fig.3) , the structure of the nylon which exists on the surface of the nylon particle is not completely observed in the surface of the CELLYARD beads . This means that the particle surface of the CELLYARD beads is covered with hydroxyapatite nearly completely . Therefore , the CELLYARD beads has the capability to adsorb various protein , a cell , etc. like hydroxyapatite (Fig.4) .[1)]

2）The particle size of the CELLYARD beads is suitable for adhesion and multiplication of cells .[2)]

3）The specific gravity of the CELLYARD beads (1.01～1.05 g/cm^3) leads suspension in calm agitation and spontaneous sedimentation in standing condition , and is suitable for recovery of the CELLYARD beads or medium .

4）The CELLYARD beads do not swell in solution .

3. USAGE

The CELLYARD beads is suitable for high-density culture of various attachment dependent cell , but optimum condition , such as capacity of culture flask , form , and agitation speed , change with kind of cell . Therefore , this instruction manual explains the method for culture of the Vero cell (the African green monkey kidney origin cell) using spinner flask for 100 mL .

1) STERILIZATION

50g the CELLYARD beads suspended to 500 mL PBS(-) are carried out the autoclave sterilization (121℃, 20 min) . The CELLYARD beads is finely dispersed after sterilization , although it may be hard to disperse to PBS(-) at first . Sterilized suspension (100 g/l) is conserved at room temperature (Fig.5) .

Fig.5 CELLYARD beads after sterilization

※ Please perform operation of following 2)－4) within the clean bench of aseptic condition .

2) WASHING

10 mL of suspension of the CELLYARD beads prepared in 1) is moved to another centrifugal tube which sterilized (Fig.6) , and supernatant is discarded by centrifugation (1600 rpm, 5 min) . You may carry out spontaneous sedimentation without using centrifuge . 10 mL of the MEM medium (FCS free) is added to the pellet of the CELLYARD beads , and is washed . Then, centrifugation (1600 rpm, 5 min) or spontaneous sedimentation is carried out and supernatant is discarded .Please repeat this operation 3 times .

Fig.6 The suspension of CELLYARD beads is moved to centrifugal tube .

10 mL of MEM medium (10% FCS) is newly added to the pellet of the CELLYARD beads in order to prepare the suspension of the CELLYARD beads .

Fig.7 CELLYARD beads is suspended to the medium .

※※ Please use a pipette with the large path of the hole at a tip .

Fig.8 The recovery of the cell

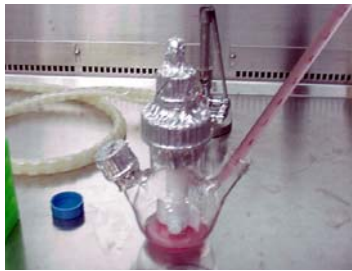



Fig.9 Suspension of the CELLYARD beads and the cell are added to the spinner flask .

Fig.10 It is stood in the adhesion stage of the cell without agitation .

Fig.11 The medium is added to the final volume .

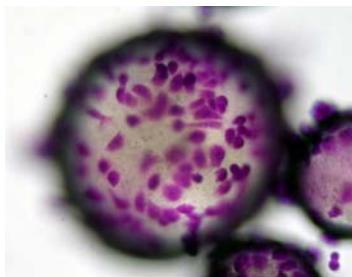



Fig.12 The CELLYARD beads in which the Vero cell adhered . (The culture start post-3 hour course)

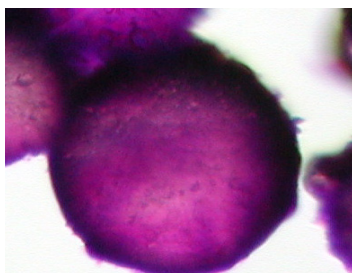



Fig.13 The CELLYARD beads that the surface is perfectly covered by the Vero cell . (The culture start post-3 day course)

3) PREPARATION OF THE CELL

The cell is recovered at 20 mL of MEM medium (10% FCS) in order to prepare the suspension of the cell , so that the concentration of seeding cell may consist as 1.0×10^7 cells (Fig.8) .

4) SEEDING OF THE CELL

In sterilized spinner flask (for 100 mL) , 10 mL of suspension of the CELLYARD beads prepared in 2) and 20 mL suspension of the cell prepared in 3) are added , and the whole volume is done at about 30 mL , 1/3 of the final volume (Fig.9) .

5) CULTURE START

The spinner flask is stood in incubator (37℃, 5% CO_2) in the condition of 4) . It is stood for 3 hours (the adhesion stage of the cell) from the culture start without connected agitation (Fig.10) . In the time, please do 1 minute agitation at 37 rpm speed every 60 minute . In this time agitation speed , you do not mind at the speed in the case of the connected agitation in the vegetation stage of the cell . 3 hours passed, and MEM medium (10% FCS) is added in the clean bench to the final volume (100 mL) , and the connected agitation is started (Fig.11) .

The aspect of the cell which passed of culture start post-3 hour and for 3 days is shown in (Fig.12) and (Fig.13) .

4．ATTENTION IN THE HANDLING

1）By seeding cell , standing time in the adhesion stage must be adjusted in the about 3－6 hour . And, there is the case in which the connected agitation should be done by adding the medium of the final volume right after the seeding of the cell, and the agitation should not be completely done, while it is being stood in the adhesion stage. By adjusting optimum culture condition of seeding cell, please use the CELLYARD beads.

2）It is recommended that the medium used for washing of the CELLYARD Beads and culture are beforehand equilibrated in incubator at 37℃ and 5%CO_2 . So, the CELLYARD beads can be used more effectively.

3）Please do not dip the CELLYARD beads in acid solution and solution including chelating reagent and organic solvent such as acetone , xylene , and so on . The performance may deteriorate.

4）There is no problem on the performance, though the particle of black or brown may have been mixed in the product.

5）Please dispose of the CELLYARD beads as an incombustible refuse after the use.

5．REFERENCE

1) Yamamoto A., Nakajima T., Tominaga Y. and Ogawa T.: Porus hydroxyapatite ceramics , Tiss. Cult. Res. Commun. 18 , 235－244, 1999
2) Shibata T.: The world of the bioreactor－the base and application for the practice person , Hario Laboratory Co.,Ltd. , 231, 1992
3) Sugo K., Kato M., Ishikawa T., Yamamoto A. and Ogawa T.: Hydroxyapatite microcarrier (1), Tiss. Cult. Res. Commun. 25, 105-111, 2006
4) Sugo K., Kato M., Ishikawa T., Yamamoto A. and Ogawa T.: Hydroxyapatite microcarrier (2), Tiss. Cult. Res. Commun. 25, 113-118, 2006
5) Sugo K. and Ogawa T.: Three-dimensional Culture of Rat Bone Marrow Cells Using Hydroxyapatite Microcarrier, Tiss. Cult. Res. Commun. 26, 125-131, 2007
6) Sugo K., Nakayama M., and Ogawa T.: Japanese Encephalitis Virus Production Using Hydroxyapatite Microcarrier, Medicine and Biology. 151 (7), 237-243, 2007

E200804

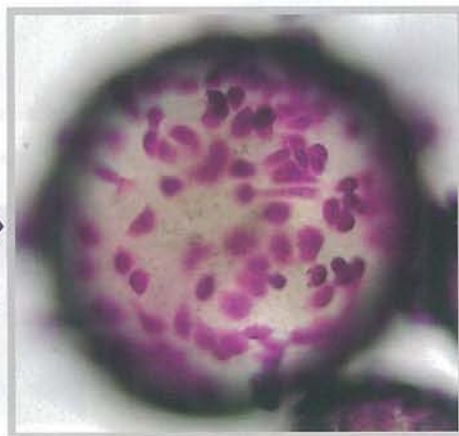
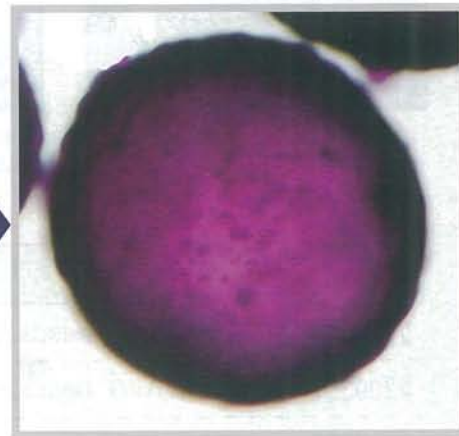
Distributor
TOYO 2CHOME, KOTO-KU, TOKYO, 135-0016, JAPAN
http://www.cosmobio.co.jp e-mail : export@cosmobio.co.jp
Phone : +81-3-5632-9617 FAX : +81-3-5632-9618

PENTAX

CELLYARD™ beads

Surface activated cell carrier beads for high density cell culture

CELLYARD™シリーズはペンタックスが開発した細胞培養用担体の総称です。
CELLYARD™ beadsは、平均粒径200μmのナイロン粒子表面をハイドロキシアパタイト[$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$]の微小粒子で被覆した微小球体です。ハイドロキシアパタイトは、生体適合性が極めて優れているリン酸カルシウム系化合物で、各種人工骨などに用いられています。弊社ではこのようなハイドロキシアパタイトの性質に着目し、生物学的親和性に優れたマイクロキャリアー培養用担体を開発しました。
これにより様々な付着依存性細胞の高密度大量培養が可能となります。

培養前

Vero細胞培養開始後３時間経過

Vero細胞培養開始後３日間経過

※染色はクリスタルバイオレットを用いた。

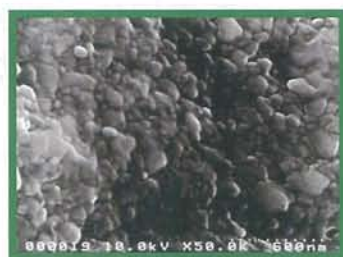
特徴

1. 高純度ハイドロキシアパタイトと同様に、多様なタンパク質および細胞等を吸着します。
2. オートクレーブ(121℃、20分)滅菌が可能です。
3. 粒径は細胞の付着、増殖に適するように調製してあります。
4. 比重は1.03g/cm^3程度に調製してあるため、穏やかな撹拌で均一に懸濁しやすく、かつ静置状態で自然沈降します。
5. 溶液中でも膨潤しません。
6. 500μmタイプは曲率の穏やかな培養表面を実現しました。

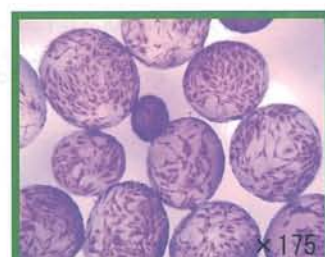
CELLYARD™ beads

	CELLYARD™ beads200	CELLYARD™ beads500
比　重:	1.01 ～ 1.05 g/cm³	1.01 ～ 1.05 g/cm³
粒　径:	200 μm ± 50 μm	500 μm ± 75 μm
かさ密度:	0.55 ～ 0.67 g/cm³	0.55 ～ 0.67 g/cm³
オートクレーブ耐性:	121°C, 1 barにおける高圧蒸気滅菌が可能です。	
化学的安定性:	pH 5以下の溶媒（クエン酸塩、酢酸塩）およびEDTA等の作用で表面のハイドロキシアパタイトが溶解しますので、これらの物質が高濃度に含まれている溶液中では使用しないで下さい。	

CELLYARD™ beads200

CELLYARD™ beads200のSEM画像

ハイドロキシアパタイト粒子で被服されたCELLYARD™beads200 表面のSEM画像

CELLYARD™ beads500

CELLYARD™ beads500のSEM画像

Vero細胞培養後3日目の画像

Code No.	品名	容量	価格
2200350	CELLYARD™ beads200	50 g	¥ 18,000
2200351	CELLYARD™ beads200	100 g	¥ 28,000
2200352	CELLYARD™ beads200	500 g	¥ 120,000
2200358	CELLYARD™ beads500	50 g	¥ 18,000
2200356	CELLYARD™ beads500	100 g	¥ 28,000
2200357	CELLYARD™ beads500	500 g	¥ 120,000

参考文献

1. Sugo K, Kato M, Ishikawa T, Yamamoto A and Ogawa T, HYDROXYAPATITE MICROCARRIER(1). Tiss.Cult. Res. Commun. 2006;25:105-111.
2. Sugo K, Kato M, Ishikawa T, Yamamoto A and Ogawa T, HYDROXYAPATITE MICROCARRIER(2). Tiss.Cult. Res. Commun. 2006;25:113-118.
3. Sugo K and Ogawa T, Three-dimensional Culture of Rat Bone Marrow Cells using Hydroxyapatite Microcarrier. Tiss.Cult. Res. Commun. 2007;26:125-131.
4. Sugo K, Nakayama M and Ogawa T, Japanese Encephalitis Virus Production using Hydroxyapatite Microcarrier.Medicine and Biology.2007;151(7):237-243

PENTAX
HOYA株式会社
PENTAX ニューセラミックス事業部
〒174-8639　東京都板橋区前野町2-36-9
TEL: 03-3960-1290
FAX: 03-3960-2681

E100401　2008.04

CELLYARD™ beads 200

Surface activated cell carrier beads for high density cell culture

取扱説明書

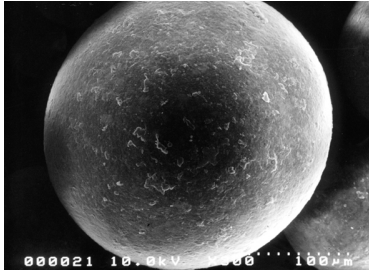



図１　CELLYARD beads の SEM 画像

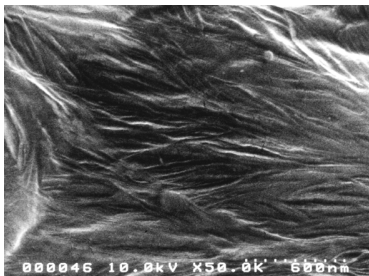



図２　ナイロン粒子表面の SEM 画像

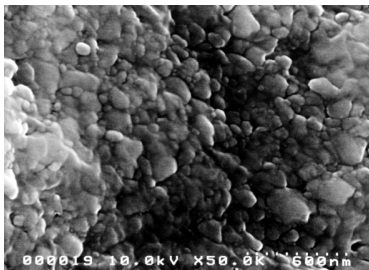



図３　CELLYARD beads 表面の SEM 画像

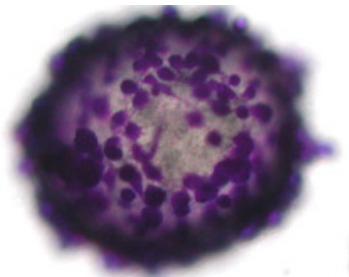



図４　CELLYARD beads 表面に付着した C6/36 細胞

１．CELLYARD beads の用途

付着依存性細胞の高密度培養

２．CELLYARD beads の特徴

１）CELLYARD beads(図１)は、平均粒径 200 μm のナイロン粒子表面をハイドロキシアパタイト〔$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$〕の微小粒子で被覆した微小球体です。ハイドロキシアパタイトは生物的親和性が極めて優れているリン酸カルシウム系化合物で各種人工骨などに用いられています。ナイロン粒子と CELLYARD beads の表面を比較すると、ナイロン粒子表面(図２)に存在するナイロンの構造は、CELLYARD beads 表面(図３)では全く見られなくなっています。このことは、CELLYARD beads の粒子表面がほぼ完全にハイドロキシアパタイトで被覆されていることを意味しています。したがって CELLYARD beads は、ハイドロキシアパタイトと同様に多様なタンパク質、細胞等を吸着する能力を有します[1)](図４)。

２）CELLYARD beads の粒径は細胞の付着、増殖に適するように調製してあります[2)]。

３）CELLYARD beads の比重は 1.03 g/cm³ 程度と小さいため、穏やかな撹拌で均一に懸濁しやすく、かつ静置状態で自然沈降して培養液または CELLYARD beads を回収しやすいように調製してあります。

４）CELLYARD beads は溶液中でもほとんど膨潤しません。

PENTAX

３．CELLYARD beads の使用方法

CELLYARDS beads は様々な付着依存性細胞の高密度培養に適していますが、細胞の種類により培養フラスコの容量、形状、撹拌速度等の最適条件が異なります。したがって本取扱説明書では、Vero 細胞(アフリカミドリザル腎臓由来細胞)を 100 ml 用スピンナーフラスコを用いて培養する方法を説明します。

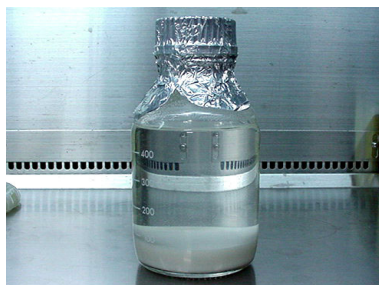



図５　滅菌後の CELLYARD beads

図６　CELLYARD beads の懸濁液 10ml を遠沈管に移す。

図７　CELLYARD beads を使用する培地に懸濁する。

図８　細胞の回収

1）CELLYARD beads の滅菌

CELLYARD beads 50 g を PBS(-) 500 ml に懸濁し、オートクレーブで滅菌します(121℃、20 分)。 CELLYARD beads は初め PBS(-)に分散しにくいことがありますが、オートクレーブ滅菌後きれいに分散します。滅菌した懸濁液(100 g/l)は室温で保存しておきます(図５)。

※長期保存ではビーズ劣化の可能性がありますので、使用時調製してください。

※※以下 ２）～４）の操作は無菌状態のクリーンベンチ内で行ってください。

2）CELLYARD beads の洗浄

1）で調製した CELLYARD beads の懸濁液 10 ml を、別の滅菌した遠沈管へ移し(図６)、遠心(1600 回転、５ 分)して上清の PBS(-)を廃棄します。遠心分離機を使用せず自然に沈降させても構いません。CELLYARD beads のペレットへ MEM 培地(血清不含)10 ml を加え洗浄します。その後遠心(1600 回転、５ 分)または自然沈降させて、上清の培地を廃棄します。この操作を３回繰り返した後、新たに培地(10%血清含有)10 ml を加え、CELLYARD beads の懸濁液とします(図７)。

※※※ピペットは先端穴径の大きいものを使用してください。

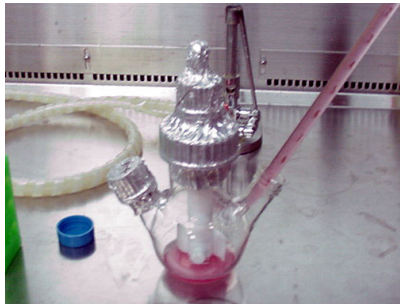



図９　CELLYARD beads 及び細胞の懸濁液をスピンナーフラスコに加える。

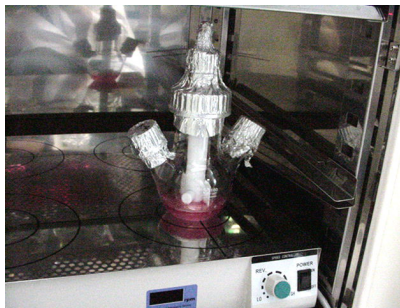



図 10　細胞の付着期は撹拌せずに静置する。

図 11　培地を最終容量まで加える。

3）細胞の準備

播種する細胞が 1.0×10^7 個程度になるように培地(10%血清含有)20 ml で回収し、細胞の懸濁液とします(図８)。

4）細胞の播種

滅菌したスピンナーフラスコ(100 ml 用)に、2)で調製した CELLYARD beads の懸濁液 10 ml と、3)で調製した細胞の懸濁液 20 ml を加え、全体の容量を 30 ml 程度(最終容量の 1/3)にします(図９)。

5）培養開始

4)の状態でスピンナーフラスコをインキュベーター(37℃、5%CO_2)に設置します。培養開始から３時間(細胞の付着期)は連続撹拌せずに静置します(図 10)。その際 60 分毎に１分間 37 rpm で撹拌してください。このときの撹拌速度は、生育期に連続撹拌するときの速度と同じで構いません。３時間経過したらクリーンベンチ内で培地(10%血清含有)を最終容量(100 ml)まで加え、連続撹拌を開始します(図 11)。

培養開始３時間後(図 12)および培養３日目の様子を(図 13)に示します。

図 12　Vero 細胞が付着した CELLYARD beads（培養開始３時間後）

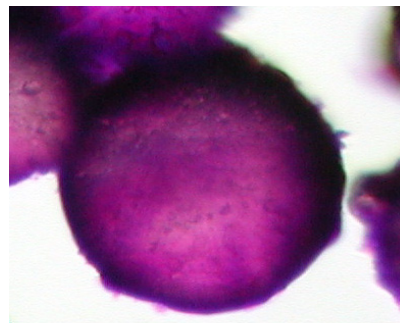



図 13　Vero 細胞により表面が覆い尽くされた CELLYARD　beads（培養３日目）

４．取扱上の注意

１）播種する細胞によっては、付着期の静置時間を 3～6 時間程度で調節する必要があります。また、細胞の播種直後から最終容量の培地で連続撹拌したほうがよい場合や、付着期で静置させている間はまったく撹拌しないほうがよい場合もあります。播種する細胞の最適培養条件に合わせ、CELLYARD beads を使用してください。
２）CELLYARD beads の洗浄および培養に使用する培地は、あらかじめ 37℃、5% CO_2 のインキュベーターで平衡化しておくことをおすすめします。これにより CELLYARD beads をより効果的に使用することができます。
３）CELLYARD beads を酸性溶液やキレート剤を含む溶液またはアセトン、キシレン等の有機溶媒に浸さないでください。性能が劣化することがあります。
４）製品に黒色または茶色の粒子が混ざっていることがありますが、性能に関して問題はありません。
５）使用後の CELLYARD beads は、不燃ゴミとして廃棄してください。

５．仕様

比重：	1.01～1.05 g/cm³
粒径：	200μm±50μm
かさ密度：	0.55～0.67 g/cm³
オートクレーブ耐性：	121℃、1bar における高圧蒸気滅菌が可能です。
化学的安定性：	ｐＨ５以下の有機溶媒(クエン酸塩、酢酸塩等)、および EDTA 等の作用で表面のハイドロキシアパタイトが溶解しますので、これらの物質が高濃度に含まれている溶液中では使用しないで下さい。

６．参考文献

1) 山本　晃、中島武彦、冨永芳恵、小川哲朗：多孔質ハイドロキシアパタイトセラミックス、Tiss. Cult. Res. Commun. 18 , 235－244 , 1999
2) 柴田武弘：バイオリアクターの世界－実践者のためのその基礎と応用－、株式会社ハリオ研究所 , 231 , 1992
3) Sugo K., Kato M., Ishikawa T., Yamamoto A. and Ogawa T.: Hydroxyapatite microcarrier (1), Tiss. Cult. Res. Commun. 25, 105-111, 2006
4) Sugo K., Kato M., Ishikawa T., Yamamoto A. and Ogawa T.: Hydroxyapatite microcarrier (2), Tiss. Cult. Res. Commun. 25, 113-118, 2006
5) Sugo K. and Ogawa T.: Three-dimensional Culture of Rat Bone Marrow Cells Using Hydroxyapatite Microcarrier, Tiss. Cult. Res. Commun. 26, 125-131, 2007
6) Sugo K., Nakayama M., and Ogawa T.: Japanese Encephalitis Virus Production Using Hydroxyapatite Microcarrier, Medicine and Biology. 151 (7), 237-243, 2007

HOYA 株式会社
PENTAX ニューセラミックス事業部
〒174-8639 東京都板橋区前野町 2-36-9
TEL (03)3960-1290　FAX (03)3960-2681

E200804